# Der Einfluß von Licht auf die circadiane Rhythmik von Euglena gracilis bei Autotrophie und Mixotrophie

**Dissertation**
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

**Gertraude Schnabel**
aus Greiz
1968

9432

# Der Einfluß von Licht auf die circadiane Rhythmik von Euglena gracilis bei Autotrophie und Mixotrophie

**Dissertation**
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

**Gertraude Schnabel**
aus Greiz
1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Februar 1968

Dekan: Prof. Dr. R. Schönenberg

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bünning
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Metzner

I. EINLEITUNG

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Abkürzungen, Begriffe, Statistik
2. Material und Anzucht
3. Testverfahren

III. EINFLUSS DES TESTLICHTES

1. Intensität
2. Rhythmik
3. Fremderregung

IV. EINFLUSS VON LICHT AUF DIE RHYTHMIK DER DUNKELBEWEGLICHKEIT

A. Autotrophe Kulturen

1. Dauerlicht und Dauerdunkel mit Testlicht
2. Periodenlänge unter Testbedingungen
3. Einmalige Dunkelperiode im Dauerlicht
4. Einmaliges Störlicht unter Testbedingungen
   a. Lichtdauer
   b. Beleuchtungsstärke
   c. Response-Kurve
   d. Schwingungsbreite

B. Mixotrophe Kulturen

1. Periodenlänge unter Testbedingungen
2. Einmaliges Störlicht unter Testbedingungen

V. DISKUSSION

1. Periodenlänge und Mitnahmebereich
2. Störlicht

VI. ZUSAMMENFASSUNG

VII. LITERATUR

## I. EINLEITUNG

Bei der Untersuchung von Zeitmeßvorgängen (BÜNNING, 1967) haben einzellige Organismen höheren Pflanzen gegenüber die Vorteile eines einfacheren Baues und einer schnelleren Vermehrung. Ein geeignetes Untersuchungsobjekt ist der grüne Einzeller Euglena gracilis. Unter Ausnutzung der phototaktischen Reaktion haben PITTTENDRIGH und BRUCE (1958) die Wirkung verschieden langer Lichtsignale auf die circadiane Rhythmik dieses Flagellaten untersucht. Die Art des Testes erlaubte Messungen jedoch nur über einen sehr kurzen Zeitraum. Benutzt man als "Zeiger" der "Uhr" statt des phototaktischen Verhaltens der Euglena-Zellen ihre Beweglichkeit in abgedunkelter Kultur, so lassen sich Schwankungen mit Perioden von ungefähr 24 Stunden über mehrere Wochen verfolgen. Mit dieser Methode, die Dunkelbeweglichkeit als "Zeiger" des Verlaufes der circadianen Rhythmik zu benutzen, hat BRINKMANN (1966) das Temperaturverhalten von Euglena gracilis untersucht. Dabei waren deutliche Unterschiede festzustellen zwischen Kulturen, deren Stoffwechselenergie nur aus der Photosynthese stammte, und anderen Kulturen, die zusätzlich noch organische Verbindungen ins Nährmedium bekamen. Diese unterschiedliche Reaktion von autotroph und mixotroph lebenden Zellen auf die Temperatur gibt Anlaß zu der Frage, wie sich die Kulturen bei verschiedener Ernährung gegenüber Lichtreizen verhalten.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Abkürzungen, Begriffe, Statistik

Abkürzungen und Begriffe entsprechen weitgehend dem "circadianen Wortschatz" (ASCHOFF, KLOTTER, WEVER, 1965). Der Begriff Zeitgeber wird für eine einmalige Störung verwendet. Eine periodische Störung wird als Fremderregung bezeichnet.

Das Kulturalter wird in Tagen nach Übertragung in die Testbedingung angegeben. Mittelwerte werden aus mindestens drei Parallelversuchen errechnet. Als Maß der Streuung wird die Standardabweichung s angegeben nach der Formel:

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (\bar{x} - x_i)^2}{(n-1)}}$$

2. Material und Anzucht

Versuchsobjekt ist Euglena gracilis, Stamm 1224-5/9 aus der Algensammlung Pringsheim in Göttingen. Die Anzucht erfolgt immer mixotroph (d.h. organische Verbindungen und Licht dienen als Energiequellen) in unbegasten Erlenmeyer- oder Fernbachkolben bei 25°C im Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 h (Osram-Leuchtstoffröhren HNW und HNT, 1500 Lux) in einer organischen Nährlösung. Diese Lösung enthält auf 1000 ml Aqua bidest.:

5 g Witte-Pepton
5 g Glucose
2 g Zitronensäure
0,5 g $KH_2PO_4$
0,2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,2 ml Leberextrakt (mit Spurenelementen und Vitamin $B_1$, $B_2$, $B_{12}$) "Iloban", Fa. Merck

Zu Versuchen werden autotrophe und mixotrophe Kulturen benutzt. Mixotrophe Kulturen werden aus Anzuchtkulturen, die gerade die stationäre Phase des Wachstums erreicht haben, auf eine Dichte von ca. 1 Million Zellen pro Milliliter verdünnt. Da die Zelldichte in frischer organischer Nährlösung erneut zunimmt, verarmt das Medium an Nährstoffen. Die Zellen gehen allmählich und unkontrollierbar zur autotrophen Lebensweise über, d.h. Licht und damit die Photosynthese wird zur einzigen Energiequelle für den Einzeller. Versuche mit mixotroph lebenden Euglenen können

daher nur in den ersten 14 Tagen nach Übertragung in Testbedingungen durchgeführt werden.
Autotrophe Kulturen erhält man durch Abzentrifugieren der Zellen von der organischen Nährlösung, Waschen mit anorganischem Substrat und Übertragen in eine anorganische Lösung. Diese Lösung enthält auf 1000 ml Aqua bidest.:

1 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$
0,5 g $KH_2PO_4$
0,25 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

Autotrophe Testkulturen werden mit einer Zelldichte von 2 Millionen Zellen pro Milliliter angesetzt. Frühestens 6 Tage nach Substratwechsel werden Versuche mit autotroph lebenden Zellen durchgeführt. Vor dieser Zeit treten Übergangszyklen auf. Danach lassen sich autotrophe Euglena-Kulturen über Monate für Versuche benutzen. Ihre Zelldichte verändert sich nicht wesentlich. Zellteilungen finden nicht statt. Küvetten mit luftdicht abschließenden Deckeln zeigen völlig gleiches Verhalten wie solche mit lose aufsitzenden Deckeln. Stehen Küvetten längere Zeit unter den Testbedingungen, so bleichen die Zellen aus und zeigen gelb-grüne Farbe. Die Testlichtmenge ist nicht optimal. Sobald die gleichen Einzeller wieder mit ausreichend Licht (12:12 Licht-Dunkel-Wechsel) versorgt werden, ergrünen sie erneut. Die Schwingungseigenschaften werden davon nicht beeinflußt.
Die Übertragung in ein anderes Substrat bzw. in Testlichtbedingungen erfolgt immer am Ende der Lichtperiode der Anzuchtbedingung. Die Testkultur behält so die Rhythmik und Phasenlage der Anzucht. Sterile Bedingungen werden stets eingehalten.

3. Testverfahren

Die Beweglichkeit der Euglena-Zellen hängt von der Tageszeit ab. In der Mitte ihrer physiologischen Nachtzeit ist

die Beweglichkeit am geringsten. Die Zellen sinken zu Boden, ein Teil verliert seine Geißeln und verklebt miteinander. In der physiologischen Tagphase steigen die Einzeller auf. Stets ist ein deutlicher, vertikaler Dichtegradient zu beobachten. Die größte Dichte ist immer unten. Dieses Sedimentationsgleichgewicht hängt von der Eigengeschwindigkeit der Einzelzelle ab. Mißt man die Dichte einer Euglena-Kultur in beliebiger, aber konstanter Höhe, so kann man also einen Tagesrhythmus der Dichte feststellen. Diese Beobachtung wurde von BRINKMANN (1966) zu einem Testverfahren entwickelt, nach dem hier weitergearbeitet wird:

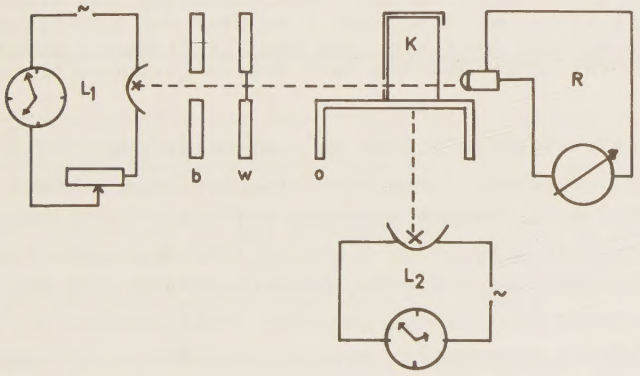



Abb. 1: Schema der Versuchsapparatur (nach BRINKMANN, 1966)
K = Testküvette mit Versuchskultur; $L_1$ = Testlichtquelle mit Spannungsregelung und 2h-Schaltuhr, Niedervoltlampe mit kleinem Emissionsfleck und Parabolrefelektor; b = Blende, 5 cm Ø; w = Wärmeschutzfilter, Schott $KG_1$; R = Registrierkreis mit Silicium-Photoelement und Potentialschreiber; $L_2$ = Störlichtquelle mit 24h-Schaltuhr, Leuchtstoffröhren Osram HNW und HNT, 1000 Lux in Höhe des Küvettenbodens; o = durchstrahlbare Plexiglasbank.
10 dieser Testkanäle sind zu einer Anlage zusammengefaßt in einer lichtdichten Klimakammer, deren Temperatur 25±0,3°C beträgt. Röhrenstabilisatoren sorgen für konstante Spannung.

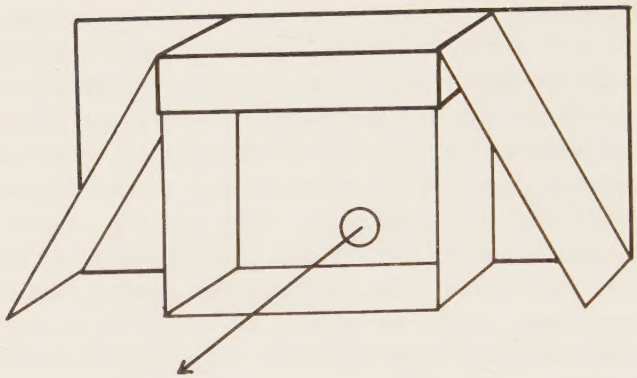


Abb. 2: Die Testküvette; Maße: 50 x 25 x 50 mm, Inhalt: 50 ml der Testkultur, darüber Überfalldeckel aus Aluminium mit Blende (Ø 10 mm, Unterrand 7 mm über dem Küvettenboden). Seitliche Spiegel bewirken, daß das für Versuche benutzte Störlicht von unten und von zwei Seiten gleichzeitig einfällt.

Durch eine kreisrunde Blende in konstanter Höhe fällt ein Testlicht horizontal durch eine planparallele Küvette auf ein Photoelement, dessen Spannung auf einem Potentialschreiber registriert wird (Abb. 1 und 2). Der Erstausschlag des Meßinstrumentes zeigt die Zelldichte an, die sich nach 100 min Dunkelheit der vorausgegangenen Dunkelperiode in Höhe der Testblende eingestellt hat. Die Zelldichte ist damit ein Maß für die Dunkelbeweglichkeit der Zellen. Ist die Beweglichkeit der Zellen groß, so ist auch die Dichte der Zellen in Höhe der Testblende groß und die Spannung am Photoelement klein. Entsprechend ergibt geringe Beweglichkeit der Euglena-Zellen geringe Dichte und großen Schreiberausschlag (Abb. 3).
Die Änderung des Zeigerausschlages im Verlaufe einer Testlichtzeit gibt die phototaktische Reaktion an. Abnahme des Zeigerausschlages am Meßinstrument bedeutet Zunahme der optischen Dichte in der Lichtfalle und damit eine positive

phototaktische Reaktion der Zellen. Umgekehrt verursacht eine negative Phototaxis Entleerung der Lichtfalle, also Zunahme des Zeigerausschlages. Die Phototaxisrhythmik erlischt nach etwa 14 Tagen. Sie wird in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da die Rhythmik der Dunkelbeweglichkeit weit exakter meßbar und auch stabiler ist.

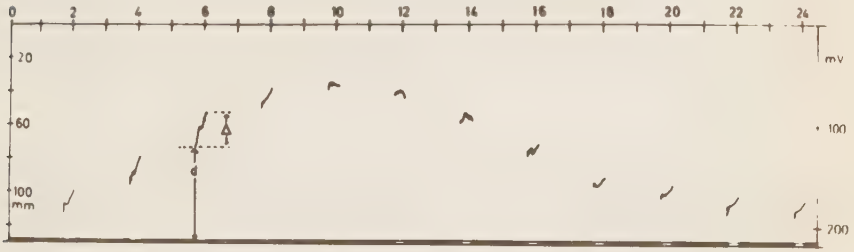



Abb. 3: Ausschnitt aus der Originalaufzeichnung von einer autotrophen Kultur am 20. Tag nach Übertragung in die Testbedingungen; Abszisse oben: Tageszeit in h; Abszisse unten: Testlichtrhythmik, 20 min Testlicht, 100 min Dunkelheit; Ordinate rechts: Ausschlag des Schreibers in mV; Ordinate links: Auswertung in mm; d = optische Dichte zu Beginn einer Testlichtzeit als Maß der Dunkelbeweglichkeit; Δ = Änderung der optischen Dichte während der Testlichtzeit als Maß der phototaktischen Empfindlichkeit.

Störlicht wird von unten und gleichzeitig über zwei seitliche Spiegel eingestrahlt, um ein phototaktisches Anlocken der Zellen zum Boden der Küvette zu verhindern. Zum Einstellen verschiedener Lichtintensitäten werden Graufilter "Cinemoid" Nr. 55 (chocolate tint) der Fa. Strand Electric, London, in den Störlichtstrahlengang eingeschoben. Die Absorption dieser Filterfolien ist zwischen 400 und 700 nm bei allen Wellenlängen etwa gleich stark.

## III. EINFLUSS DES TESTLICHTES

### 1. Intensität

Innerhalb eines Testlichtzyklus von 2 h wechseln 100 min Dunkelheit mit 20 min Licht. In 24 h erhält man so 12 Meßwerte (Abb. 3). Das weiße Testlicht hat in Höhe des Einstrahlfensters eine Intensität von 13 000 Lux ± 10 %. Diese hohe Lichtstärke ist notwendig, weil das Testlicht die einzige Energiequelle autotroph lebender Zellen ist. Die Intensität des Testlichtes hat bei konstanter Testlichtrhythmik keinen Einfluß auf die Periodenlänge (BRINKMANN, 1966).

### 2. Rhythmik

Die tägliche Testlichtzeit beträgt 240 min. Man kann statt der 20 min Testlicht in 2 h auch 10 min Testlicht pro 1 h bieten (Abb. 4). Die Ergebnisse unterscheiden sich nicht deutlich voneinander. Weitere Versuche zeigen aber, daß die Länge der Dunkelzeit zwischen zwei Lichtzeiten wichtig ist. Wechseln 5 min Testlicht mit 25 min Dunkelheit ab, so wird die Schwingung sofort gelöscht (Abb. 5).

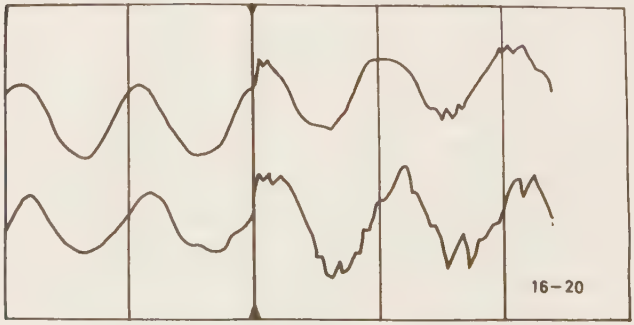



Abb. 4: Freie Schwingungen autotropher Kulturen. Links (erste 48 h) unter einem Testlichtrhythmus von 20 min Licht, 100 min Dunkel; rechts unter einem Testlichtrhythmus von 10 min Licht, 50 min Dunkel; Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h; Zahlen rechts: Kulturalter in Tagen.

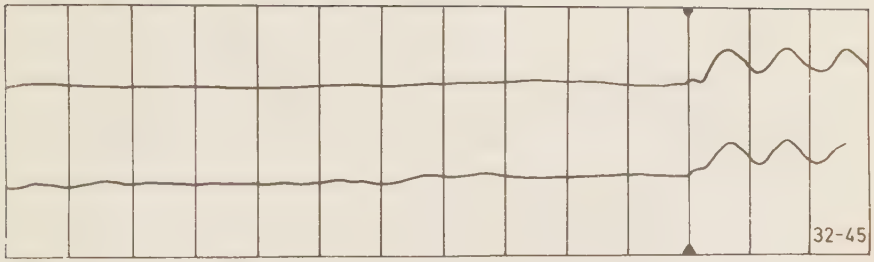



Abb. 5: Autotrophe Kulturen in einem Testlichtrhythmus von 5 min Licht und 25 min Dunkelheit. Der Pfeil markiert den Übergang zum zweistündigen Testlicht. Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h. Zahlen: Kulturalter in Tagen.

Dieses Programm wirkt wie Dauerlicht, obwohl die Gesamtlichtzeit wie bei den anderen Versuchen 240 min in 24 h beträgt. Die Dunkelzeiten sind zu kurz. Sowie das Testlicht wieder auf 20 min Licht wechselnd mit 100 min Dunkelheit umgestellt ist, setzt die Schwingung erneut ein. Auffallend ist dabei, daß das erste Minimum genau so liegt wie nach dem Ende eines Störlichtes (Abb. 12) und nach dem Ende von Dauerlicht (Abb. 10). Das zeigt klar, daß ein Testlichtzyklus von 30 min (5 min Licht, 25 min Dunkelheit) wie Dauerlicht wirkt. Die erste Stufe von 100 min Dunkelheit induziert die Schwingung, $3/2\pi$ später folgt ein Maximum. Eine längere Dunkelzeit ist für das Bestehen der Rhythmik der Dunkelbeweglichkeit unbedingt erforderlich. PITTENDRIGH und BRUCE (1957) diskutieren die Möglichkeit einer Frequenzdemultiplikation (vgl. auch WEVER, 1965). Die Testlichtrhythmik kann die Periodenlänge der circadianen Schwingung beeinflussen, wenn Vielfache der Testlichtrhythmik nahe bei 24 h liegen. Die Frage, ob eine Beeinflussung dieser Art vorkommt, wird durch unregelmäßig verteiltes

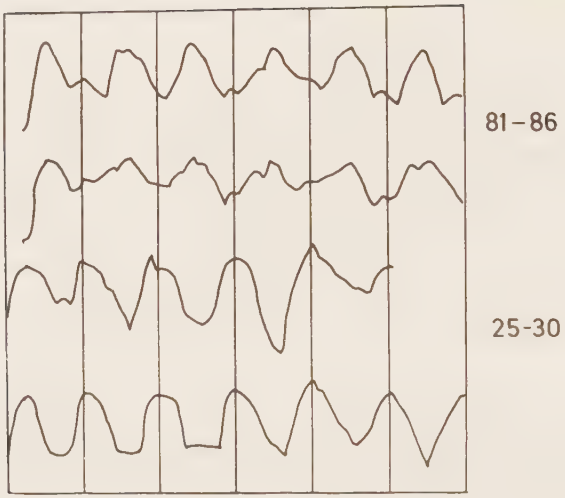


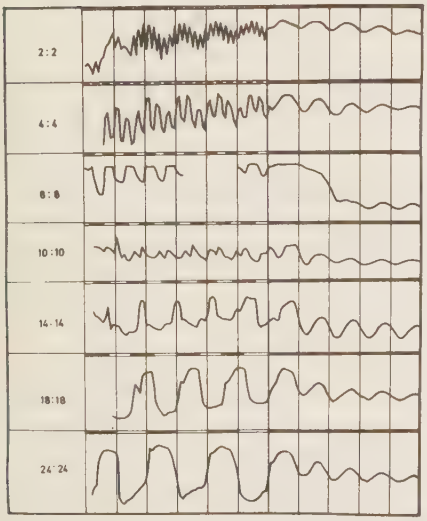

Abb. 6: 240 min Testlicht pro 24 h sind regellos über 24 h verteilt; täglich wechselndes Programm in 2 voneinander unabhängigen Versuchen mit autotrophen Kulturen. Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h; Zahlen rechts: Kulturalter in Tagen.

Testlicht geprüft. In zwei Versuchsreihen ist das Gesamttestlicht von 240 Minuten je 24 h regellos und täglich wechselnd über 24 h verteilt. Dabei beträgt die kürzeste Dunkelzeit mindestens 30 min, die längste Lichtzeit höchstens 30 min. Wie Abb. 6 zeigt, schwingen die Zellen weiter mit etwa gleicher Periodenlänge wie beim regelmäßigen 2h-Test. Verändert man innerhalb eines Testlichtzyklus von 2 h das Licht-Dunkel-Verhältnis (z.B. 60 min Testlicht, 60 min Dunkelheit), so vergrößert sich die Periodenlänge signifikant (BRINKMANN, 1967). Das wird noch deutlicher bei einem inversen Testrhythmus von 100 min Testlicht und 20 min Dunkelheit. Unter diesen Bedingungen beträgt die Periodenlänge ca. 36 h (BRINKMANN, 1967). Läge eine Frequenzdemultiplikation vor, dürften bei der konstanten Testlichtfrequenz von 2 h keine unterschiedlichen Periodenlängen auftreten. Die Perioden-

länge ist vom Licht-Dunkel-Verhältnis abhängig, nicht von der Frequenz des Testlichtes.

3. Fremderregung

Um die Grenze des Mitnahmebereiches bei Fremderregungen zu ermitteln, werden mit einem Licht-Dunkel-Verhältnis von 1:1 verschiedene Erregerperioden geprüft. (Abb. 7 und 8). Alle Fremdfrequenzen werden zwangsweise mitgeschwungen. Dabei stellt sich ein charakteristischer Phasenwinkel der biologischen Schwingung gegen die Erregerschwingung ein. In keinem Fall schwingen die Zellen in von 24 h abweichenden Erregerfrequenzen nach. Das zeigt sich ganz deutlich bei einem



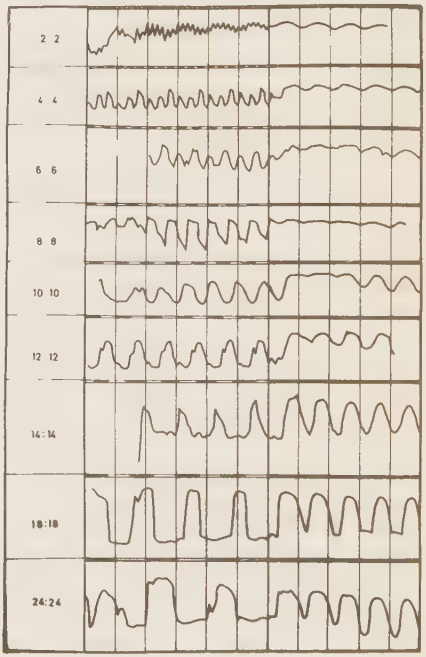




Abb. 7 links, mixotrophe
Abb. 8 rechts, autotrophe

Kulturen; Im linken Teil der Abb. ist das Verhalten bei verschiedenen Erregerfrequenzen, im rechten Teil der Abb. in den gewöhnlichen Testbedingungen wiedergegeben. Zahlen links: Fremderregerrhythmik L:D = 0:1000 Lux; Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h.

Licht-Dunkel-Wechsel von 4:4 und 2:2. Das Mitschwingen in einem so schnellen Licht-Dunkel-Wechsel ist nur als Überlagerung einer rein exogenen Schwingung mit der circadianen Schwingung aufzufassen. Es fällt daher sofort mit dem Ende des regelmäßigen Fremderregers weg. Die circadiane Grundschwingung bleibt.

Die circadiane Periode unter Fremderregungen ist deutlich länger als im anschließenden 2-h- Testlichtrhythmus. Das ist mit der Änderung des Licht-Dunkel-Verhältnisses von 1:1 auf 1:5 erklärbar (siehe Seite 10).

Auffallend ist die starke Dämpfung der Rhythmik nach dem Ende der Fremderregung in den Grenzen des Ziehbereiches zwischen 6:6 und 8:8 h.

Ähnlich wie ein Wechsel von Licht und Dunkel wirkt bereits ein Wechsel zwischen hoher und geringer Intensität. Die Differenz von 1000 zu 150 Lux ist ausreichend, die Zellen werden synchronisiert.

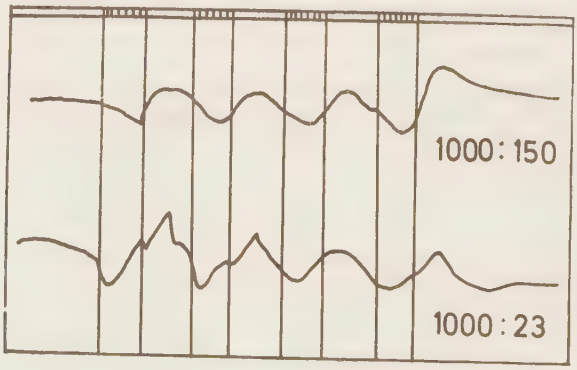



Abb. 9: Autotrophe Kulturen unter einem Wechsel von 14 h 1000 Lux und 10 h 150 bzw. 11 Lux. Ausgangs- und Endbedingungen: Dauerlicht von 1000 Lux. Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h.

## IV. EINFLUSS VON LICHT AUF DIE RHYTHMIK DER DUNKELBEWEGLICHKEIT

### A. Autotrophe Kulturen

#### 1. Dauerlicht und Dauerdunkel mit Testlicht

Im Dauerlicht erlischt die Rhythmik der Dunkelbeweglichkeit. Beim Übergang von den beschriebenen Testbedingungen (20 min Testlicht, 100 min Dunkelheit) zu Dauerlicht wird die begonnene Schwingung mit dem Erreichen des Minimums beendet (Abb. 10). Eine weitere Schwingung wird nicht ausgelöst.

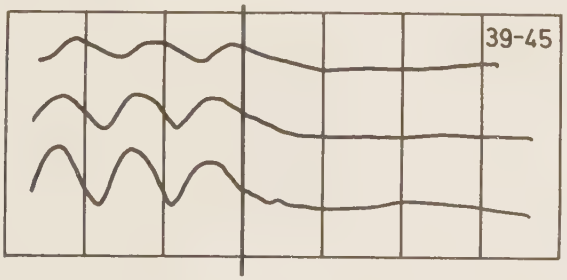



Abb. 10: Übergang von Testbedingungen zu Dauerlicht (dicker Strich); Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h; Zahlen rechts: Kulturalter in Tagen.

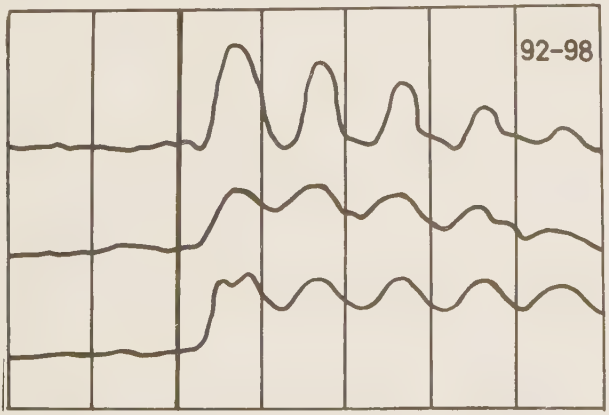



Abb. 11: Übergang von Dauerlicht zu Testbedingungen (dicker Strich); Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h; Zahlen rechts: Kulturalter in Tagen.

Umgekehrt wird beim Übergang von Dauerlicht zu den Testbedingungen sofort eine Schwingung induziert, die über Wochen andauert (Abb. 11). Die Dunkelzeiten innerhalb der Testlichtintervalle sind für das Weiterbestehen einer Schwingung wichtig. Im Dauerdunkel ohne Testlicht schwingen die Zellen auch. Sie zeigen beim Wiedereinschalten des Testlichtes genau die Phase, die sie entsprechend der Länge der Dunkelheit haben müßten: die bei Weiterlaufen der Schwingung zu erwarten ist (BRINKMANN, 1966).

2. Periodenlänge unter Testbedingungen

Die Periodenlänge wird als zeitlicher Abstand zweier Minima gemessen. Das Minimum ist der am genauesten bestimmbare Phasenpunkt der Dunkelbeweglichkeit. Auch bei Phaseolus ist der Extremwert der physiologischen Nachtphasen, dort also das Blattsenkungsmaximum der am sichersten bestimmbare Phasenpunkt (BÜNNING, 1967). Das Minimum dient deshalb auch hier als Nullpunkt bei der Bestimmung des Phasenwinkels. Der geschätzte Meßfehler zwischen zwei Minima beträgt 1 h. Mißt man bei der Bestimmung der Periodenlänge mehrere ungestörte Schwingungen (mindestens drei Perioden bei mixotrophen, mindestens vier Perioden bei autotrophen Kulturen), so ist der Meßfehler entsprechend geringer und liegt im Bereich der biologischen Schwankung.
Die Periodenlänge ist bei autotroph lebenden Euglena-Kulturen nicht von der Temperatur abhängig (BRINKMANN, 1966). Alle hier beschriebenen Versuche sind bei 25°C durchgeführt. Die mittlere Periodenlänge beträgt $23{,}0 \pm 0{,}3$ h (Mittel aus 70 vermessenen Kurven mit insgesamt 400 Einzelschwingungen). Ähnliche Werte wurden von BRINKMANN (1966) und FELDMANN (1967) ermittelt.

3. Einmalige Dunkelzeit im Dauerlicht

Zur Auslösung einer Schwingung im Dauerlicht genügen schon wenige Stunden Dunkelheit. Abb. 12 zeigt an einigen Bei-

spielen die Wirkung verschieden langer Dunkelzeiten im Dauerlicht. Das anschließende Dauerlicht dämpft die Schwingung sofort wieder.

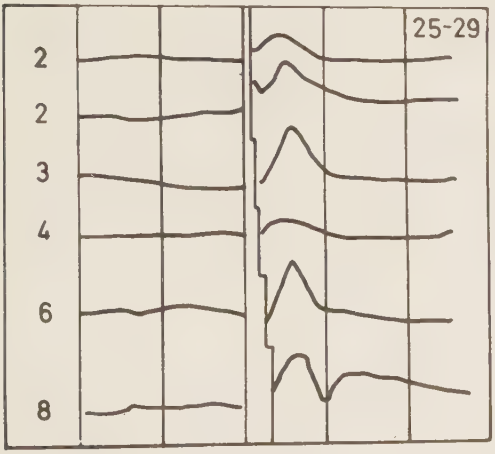



Abb. 12:
Wirkung einer kurzen Dunkelzeit innerhalb von Dauerlicht. Die Zahlen links geben die Länge der Dunkelzeit an. Vertikalen: Zeitmarken im 24-h-Abstand; Zahlen rechts: Kulturalter.

4. Einmaliges Störlicht unter Testbedingungen

Autotrophe Euglena-Kulturen reagieren auf einen einmaligen Lichtreiz mit einer Frequenz- und Amplitudenstörung.

a. Lichtdauer

Unabhängig davon, wie lange das Störlicht geboten wird, tritt stets 8 h (8,3 ± 1,4 h) nach "Licht aus" ein Minimum auf. Die Dauer der Lichtzeit ist nicht entscheidend, nur ihr Ende (Abb. 13).

Die Lichtzeit muß jedoch eine bestimmte Mindestdauer haben, um überhaupt wirksam zu werden. 2 h Störlicht von 1000 Lux sind die untere zeitliche Grenze. Dieses zweistündige Störlicht wirkt nicht immer phasenverschiebend. In jedem Fall verändert es aber die Amplitude. Diese ist nach einem kurzen Störlicht meistens geringer (Abb. 14, oberes und unteres Beispiel). Umgekehrt können 2 h Licht genügen, um eine nicht mehr sichtbare Schwingung anzustoßen (Abb. 14, mittleres

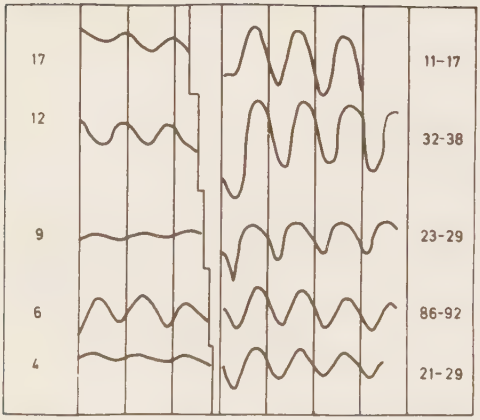



Abb. 13

Wirkung eines Störlichtes (1000 Lux) von verschiedener Dauer. Die Zahlen links geben die Länge des Störlichtes in h an. Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h; Zahlen rechts: Kulturalter in Tagen.

Beispiel). Im Bereich des Schwellenwertes für einen phasenverschiebenden Reiz muß damit gerechnet werden, daß unterschiedlich große Populationsanteile reagieren. Man kann sich die Amplitudendämpfung nach einem Störlicht von 2 h als Überlagerungsantwort denken. Die Einzelzelle reagiert nach dem Alles- oder Nichts-Gesetz. Es gibt Populationsanteile, die reagiert haben und solche, die noch nicht reagierten. 2 h Licht wirken auf eine Population nur zum Teil synchronisierend. Licht von mehr als 2 h Dauer stört in jedem Fall die gesamte Population. Eine konstante Verminderung der Amplitude

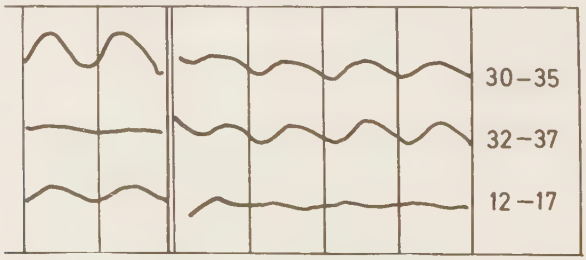



Abb. 14: Wirkung eines Störlichtes (1000 Lux) von 2 h auf die Rhythmik autotropher Kulturen; Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h; Zahlen rechts: Kulturalter in Tagen.

(Abb. 14, oben) ist zu erwarten, wenn die unterschiedlich synchronisierten Anteile sich nicht gegenseitig resynchronisieren (BRINKMANN, 1967a).

b. Beleuchtungsstärke

Weiterhin interessierte die Antwort auf die Frage, wie weit die Störlichtwirkung von der Beleuchtungsstärke abhängt. Mit einem sicher phasenverschiebend wirkenden Störlicht von 6 h werden mit zwischengeschobenen Cinemoid-Filtern folgende Beleuchtungsstärken getestet: 1000, 850, 400, 280, 170, 60, 8, 4,5, 1, 0,5 Lux. Zwischen 1000 und 4,5 Lux wirken alle Beleuchtungsstärken gleichartig phasenverschiebend (Abb. 15). Die Grenze der Wirksamkeit liegt bei etwa 1 Lux bei 6 h Pulsdauer. Das ist am besten an der Amplitudenreaktion zu erkennen. Nur Teile der Population sind synchronisiert. Bei einer Pulsdauer von 4 h sind Beleuchtungsstärken unter 10 Lux unwirksam. Ebenso unwirksam ist Störlicht von 2 h Dauer unter 50 Lux.

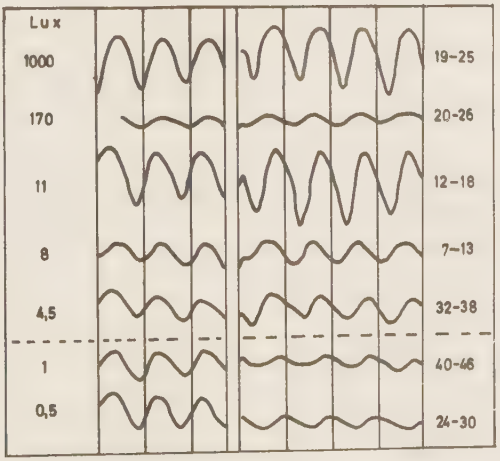



Abb. 15: Wirkung eines Störlichtes von 6 h mit verschiedenen Beleuchtungsstärken auf autotrophe Kulturen. Zahlen links: Beleuchtungsstärke in Lux; Zahlen rechts: Kulturalter; Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h; Die gestrichelte Linie gibt den Schwellenbereich an.

c. Response-Kurve

Ein Störlicht von 6 h Dauer wirkt auf autotrophe Euglena-Kulturen. Die Zellen reagieren mit einer Frequenz- und Amplitudenstörung. Diese Störung ist innerhalb der ersten 24 h nach Pulsende abgeklungen. Es gibt keine Übergangsschwingungen (transients) mit veränderter Periodenlänge. Abb. 16 zeigt die Wirkung eines sechsstündigen Störlichtes von 1000 Lux an einigen Beispielen. Die Schwingungen sind so angeordnet, daß die Zeitpunkte des gebotenen Lichtreizes untereinander liegen. Deutlich ist zu erkennen, daß die Schwingungen mit unterschiedlicher Phasenlage im linken Teil der Abb. 16 nach der Wirkung des Zeitgebers Licht im rechten Teil der Abb. 16 synchronisiert sind. Unabhängig davon, unter welchem Phasenwinkel die Eingangsschwingung getroffen wurde, tritt 8,3 ± 1,4 h nach dem Ende des Licht-

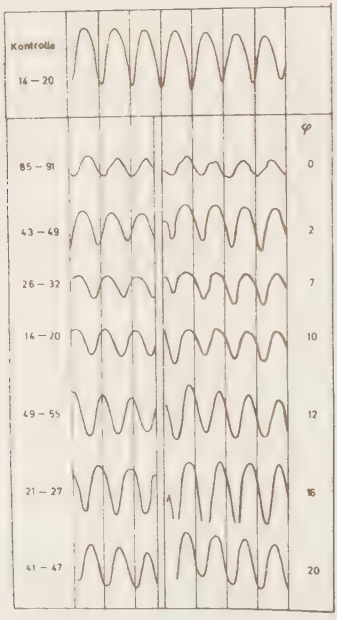



Abb. 16:

Phasenantwort der Rhythmik autotropher Kulturen nach 6 h Störlicht (1000 Lux, weiß) bei verschiedener Phasenlage des Pulsendes.

Zahlen rechts: Phasenwinkel des Pulsendes (Reizeingang); Zahlen links: Kulturalter; Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h.

reizes ein Minimum und 18,4 ± 2 h ein Maximum auf. Endet der Lichtreiz im Bereich des Maximums der Eingangsschwingung, so ist die Synchronisation am schlechtesten. Das erste Minimum tritt dann frühestens nach 10 h nach "Licht aus" auf. Trotz dieser Abweichung scheinen alle Einzelschwinger der Population gleichartig zu reagieren. Durch den Lichtreiz wird offenbar eine neue Schwingung ausgelöst, bzw. je nach Phasenlage werden die Algen zu ganz verschiedenen Phasendifferenzen zwischen der stabilen Ausgangsschwingung und der stabilen Eingangsschwingung gezwungen. Diese Phasendifferenzen sind in der Reizantwortkurve (response-Kurve) gegen den Phasenwinkel des Reizeinganges (= Licht aus) in Abb. 17 dargestellt. Dabei ist die Phasenverschiebung des 3. Minimums nach dem Pulsende gegen die Eingangsschwingung gemessen. Stets ist die geringste Phasenverschiebung zwischen Ausgangs- und Eingangsschwingung bestimmt worden. Die Phasenverschiebung wird ohne Rücksicht auf das Vorzeichen absolut betrachtet. Die Phasenverschiebung ist am größten, wenn die Phasenlage nach dem Störlicht genau

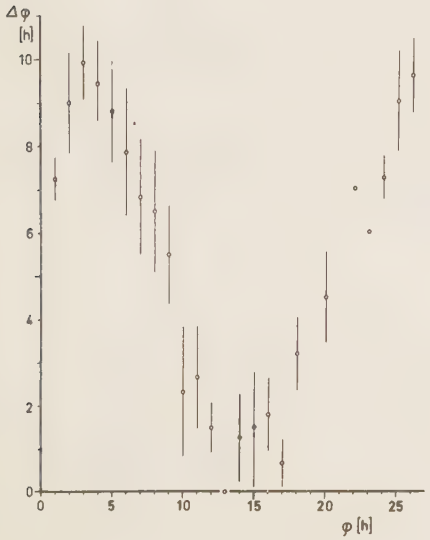



Abb. 17:

Response-Kurve für die Wirkung eines 6h-Störlichtes (weiß, 1000 Lux) auf die Rhythmik autotropher Kulturen.

Abszisse: Phasenwinkel des Pulsendes in h nach vorangegangenem Minimum.

Ordinate: Phasendifferenz der Ausgangsschwingung zur Eingangsschwingung gemessen am 3. Minimum nach Pulsende.

Standardabweichungen sind angegeben. Der response-Kurve liegen 100 Einzelversuche zugrunde.

invers ist, die Phasenverschiebung also eine halbe Periodenlänge beträgt. Diese größtmögliche Phasenverschiebung von 10-11 h wird erreicht, wenn das Ende eines Störlichtes auf den Wendepunkt der Lichtekurve zum Maximum hin (= Wendepunkt aufwärts) fällt. Am geringsten ist die Phasenverschiebung bei Pulsende im Bereich des Wendepunktes zum Minimum hin (= Wendepunkt abwärts). Die Streuung und damit die Regelunbeherheit des Oscillators ist am größten, wenn die Einzeller ihre Phase kaum verschieben müssen.

d. Schwingungsbreite

Die Schwingungsbreite ist der Abstand von Minimum zu Maximum und entspricht der doppelten Amplitude. Schwingungsbreiten von in verschiedenen Versuchen gewonnener Kurven sind nicht uneingeschränkt miteinander vergleichbar. Sie sind nämlich auch abhängig vom Kulturalter und von der Kulturdichte, mehr noch von der Empfindlichkeit der einzelnen Photoelemente und Schreiber.
Nach einem Störlicht von 6 h ist die Schwingungsbreite der Ausgangsschwingung größer als die Schwingungsbreite der Eingangsschwingung. Die Schwingungsbreite der Ausgangsschwingung im Verhältnis zur Schwingungsbreite der Eingangsschwingung ergibt den dimensionslosen Schwingungsbreiten- bzw. Amplitudenquotienten. Er beträgt $1{,}4 \pm 0{,}5$ (Mittel aus 31 Versuchen). Jeweils 4 Schwingungen nach und vor der Störung werden gemessen. Die natürliche Dämpfung fällt bei der Berechnung weg, da sie nach und vor der Störung gleich ist.

B. Mixotrophe Kulturen

1. Periodenlänge unter Testbedingungen

Die Periodenlänge mixotropher Kulturen ist unter den gewählten Testbedingungen mit 24,8 ± 0,9 h (Mittel aus 70 vermessenen Kurvenstücken mit insgesamt 300 Einzelschwingungen) fast 2 h größer als die Periodenlänge autotropher Kulturen (23,0  0,3 h). Dauerlicht wirkt auf schwingende mixotrophe Zellen ebenso dämpfend wie auf autotrophe.

2. Einmaliges Störlicht unter Testbedingungen

Ein Störlicht induziert wie bei autotrophen Kulturen eine bestimmte, stabile Phasenlage der Ausgangsschwingunge. Abb. 18 zeigt die Wirkung eines Lichtreizes von 6 h und 1000 Lux an einigen Beispielen:

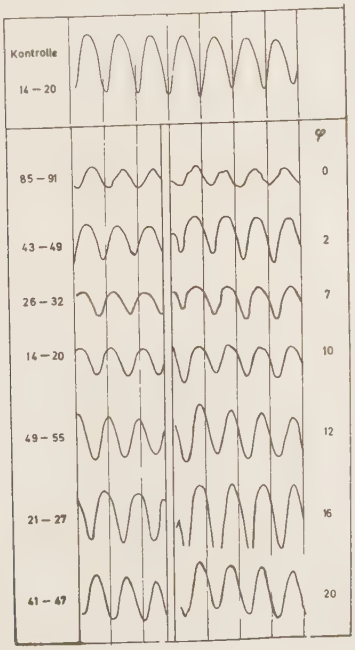



Abb. 18:

Phasenantwort schwingender mixotropher Kulturen auf ein Störlicht von 6 h und 1000 Lux (weiß) bei verschiedener Phasenlage des Pulsendes.

Zahlen rechts: Phasenwinkel des Pulsendes (Reizeingang); Zahlen links: Kulturalter; Vertikalen: Zeitmarken im Abstand von 24 h.

Das erste Minimum nach Pulsende tritt 8,8 ± 2,7 h später auf, das erste Maximum 16,2 ± 4,6 h später. Der Bereich des Maximums der Eingangsschwingung zeigt wieder die stärkste Abweichung. Grundsätzlich ist die Streuung bei mixotrophen Kulturen wesentlich größer als bei autotrophen. Das zeigt sich auch deutlich an der response-Kurve (Abb. 19).

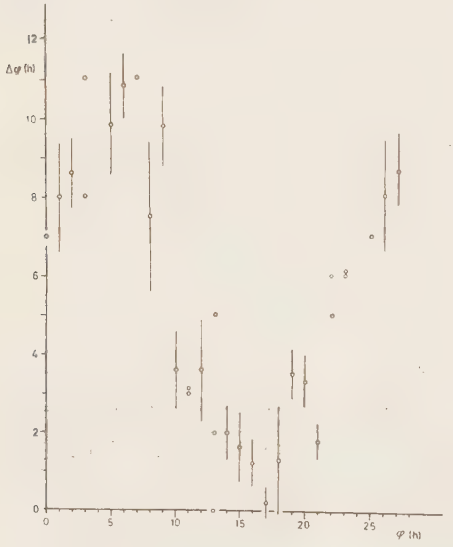



Abb. 19

Response-Kurve für die Wirkung eines Störlichtes von 6 h und 1000 Lux (weiß) auf die Rhythmik autotropher Kulturen.

Abszisse: Phasenwinkel des Pulsendes in h nach vorangegangenem Minimum

Ordinate: Phasendifferenz der Ausgangsschwingung zur Eingangsschwingung gemessen am 3. Minimum nach Pulsende.

Standardabweichungen sind angegeben.

Der response-Kurve liegen 95 Einzelversuche zugrunde. Die größte Phasenverschiebung ist wie bei autotrophen Zellen im Bereich des Wendepunktes der Eingangsschwingung zum Maximum hin, die geringste Phasenverschiebung im Bereich des Wendepunktes der Eingangsschwingung zum Minimum hin zu finden. Kurze Belichtungszeiten bis hinab zu 2 h Störlicht wirken ebenso wie 6 h Störlicht. Ein Schwingungsbreitenquotient kann schlecht bestimmt werden, da die Amplituden stark gedämpft sind. Außerdem besetzen mixotroph lebende Euglenen oft in dichtem Schleier das Testfenster, so daß die Messung erschwert ist.

## V. DISKUSSION

### 1. Periodenlänge und Mitnahmebereich

Die Periodenlänge unter gleichen Testlichtbedingungen ist bei autotroph gehaltenen Kulturen mit 23,0 ± 0,3 signifikant kürzer als die der mixotrophen mit 24,8 ± 0,9 h. Fremderregungen (L:D = 1:1) schwingen autotroph und mixotroph lebende Einzeller gezwungen mit (Abb. 7 und 8). Die Grenze des Ziehbereiches liegt bei 16 h (8:8). Bei kürzeren Licht-Dunkel-Perioden ist neben der exogenen Periode eine circadiane Grundschwingung ausgebildet. Das zeigt, daß bei diesen Perioden keine echte Mitnahme der endogenen Rhythmik erfolgt. Einige Kurven mit Fremderregungen von 6:6 lassen die circadiane Periode nicht sofort erkennen. Eine Kurvenanalyse[1)] bestätigte jedoch das Vorhandensein einer 24-h-Komponente. Andere Autoren (z.B. FLÜGEL, 1949; KLEINHOONTE, 1929 u.a.) fanden auch an anderen Objekten ähnliche Grenzwerte des Ziehbereiches. In der von WILKINS (1962) beschriebenen 3:3-Rhythmik der $CO_2$-Abgabe bei Kalanchoe ist eine circadiane Grundschwingung schwach erkennbar; Es scheint auch hier bei dem 3:3 Rhythmus eine rein exogene Schwingung vorzuliegen. Echte Mitnahme ist wohl nur bei Erregerperiodenlängen ab 16 h möglich.

Auffallend bei den 6:6, 8:8 und 10:10 Licht-Dunkel-Zyklen ist die in den nachfolgenden konstanten Bedingungen erkennbare starke Dämpfung der Rhythmik. Die Rhythmik scheint jedoch nicht ganz gelöscht zu sein, da nach einigen Tagen die circadianen Schwingungen mit wachsender Amplitude wieder einsetzen. Man kann annehmen, daß durch Licht-Dunkel-Zyklen, die nahe an der Grenze des Ziehbereiches liegen, der Oscillator gestört wird. Die beobachtbare Erholung des Oscillators unter konstanten Bedingungen läßt vermuten, daß unter

---

1) Herrn Professor Dr. BLUME danke ich für eine Kurvenanalyse

den abnormen Licht-Dunkel-Verhältnissen die normal physiologische Relation des circadianen Systems gestört wird. Unter konstanten Bedingungen wird die "innere Ordnung" wiederhergestellt. Diese "innere Ordnung" bleibt vermutlich bei Licht-Dunkel-Zyklen von 2:2 und 4:4 bestehen. Es handelt sich hier weder um Populationseffekte noch um Frequenzdemultiplikation. Eine Population sollte nach WEVER (1965) gegenüber Fremderregern einen beliebig großen Ziehbereich haben. Die hier gezeigten Beispiele sprechen dagegen. POHL wies bereits 1948 nach, daß Euglenen einen Licht-Dunkel-Wechsel von 8:8 nicht mehr synchron mitschwingen.

2. Störlicht

Störlicht wirkt sowohl auf autotrophe als auf mixotrophe Euglena-Kulturen phasenverschiebend. In gleicher Weise verhalten sich rein heterotrophe, weiße Zellen von Euglena gracilis (KIRSCHSTEIN, unveröffentlicht). Autotrophe Kulturen reagieren auf Licht schärfer als mixotrophe und heterotrophe. Ursache dieser unterschiedlich genauen Regelung könnte die Ernährung der Zellen sein. Unter autotrophen Bedingungen lebende Euglenen sind auf die Photosynthese als einzige Energiequelle stärker angewiesen als mixotroph lebende, die Zitronensäure, Glucose und Pepton als zusätzliche Energiequellen zur Verfügung haben. Unabhängig von der Dauer des Lichtreizes (Abb. 13) ist nur das Signal "Licht aus" wirksam. Am stärksten wird die Phase verschoben, wenn das Pulsende auf den Wendepunkt zum Maximum hin fällt. Fast keine Phasenverschiebung tritt auf, wenn das Licht im Wendepunkt abwärts (zum Minimum hin) ausgeht. Unabhängig von der Reizdauer und vom Phasenwinkel ist etwa 8 h nach Pulsende ein Minimum eingestellt, das in regelmäßigem Abstand der Periodenlänge wiederkehrt (Abb. 19 und 20). Das gilt für autotrophe und mixotrophe Kulturen gleichermaßen. Autotroph gehaltene Kulturen zeigen eine

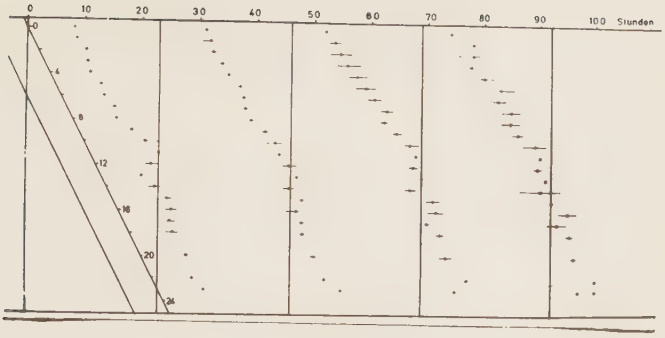



Abb. 19: Wirkung eines 6h-Störlichtes auf autotrophe Kulturen

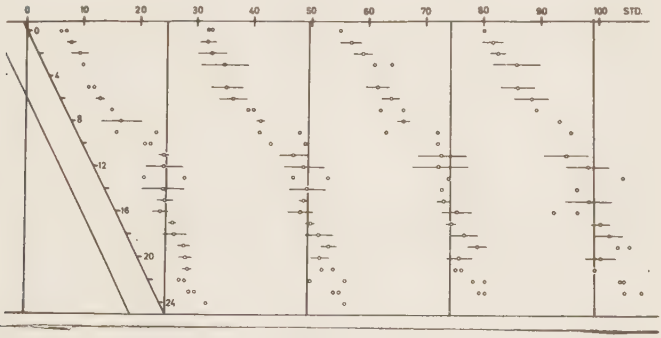



Abb. 20: Wirkung eines 6h-Störlichtes auf mixotrophe Kulturen

Zum Zeitpunkt 0 (horizontale Achse) haben alle Eingangsschwingungen ein Minimum. Die Vertikalen im Abstand der Periodenlänge geben den Zeitpunkt der folgenden Minima einer ungestörten Kontrolle an. Anfang und Ende des 6h-Störlichtes wird durch die beiden Schrägstriche links gekennzeichnet. Die Zahlen am 2. Schrägstrich geben das Ende des Lichtpulses in h nach dem Minimum an. Die Lage des 1,-4. Minimums nach Pulsende ist mit den Standardabweichungen eingetragen.

viel geringere Standardabweichung. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Unterstützung des Störlichtes bei autotroph lebenden Euglenen durch einen Temperatureffekt vorliegt.

Während eines 6 h-Störlichtes erwärmt sich die Kulturflüssigkeit. Die Steilheit der Temperaturänderung während des Störlichtes beträgt aber nur 1/3 des Schwellenwertes für die Auslösung einer Phasenverschiebung allein durch eine Temperaturstufe.

BRINKMANN (1966) hat die Beeinflussung autotropher und mixotropher Euglena-Kulturen durch Temperaturstörungen untersucht. Er stellte fest, daß mixotroph lebende Euglenen nicht auf Temperaturstufen reagieren. Autotroph lebende Kulturen zeigen eine von der Phasenlage abhängige Phasenverschiebung. Die stärkste Phasenverschiebung nach einer positiven Temperaturstufe tritt im Minimum auf. Nach einer negativen Temperaturstufe tritt nur im Wendepunkt abwärts eine deutliche, dann maximale Phasenverschiebung auf.

Phasenreaktion auf einen Störreiz

| | Licht | Temperatur |
|---|---|---|
| autotrophe Euglenen | + | + |
| mixotrophe Euglenen | + | - |
| heterotrophe Euglenen | + | - |

Negative Temperaturstufe und "Licht aus" haben den gleichen maximal verschiebenden Phasenpunkt. Das ist ökologisch sinnvoll. Mit dem Ende der Lichtzeit wird ebenso wie durch die negative Temperaturstufe das Ende eines natürlichen Tages simuliert. Die Einzeller benutzen das Signal "Licht aus" bzw. "Temperatur sinkt" als Zeitgeber zur Einordnung in den Normaltag. Im Wendepunkt aufwärts (zum Maximum hin) wird von der inneren Uhr her Lichtbeginn bzw. Temperaturanstieg erwartet. Geboten wird aber Lichtende oder Temperaturabfall. Die Phasenverschiebung ist folglich maximal. Die neue Phasenlage wird dabei so induziert, daß das nächste Maximum genau in die Mitte der nächsten Lichtphase fallen würde, falls ein natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit geboten würde. Umgekehrt zeigt sich beim Ende des Störlichtes im Wendepunkt abwärts keine Verschie-

bung der Phase. Erwartete Dämmerung und "Licht aus" fallen zusammen. Das gerade in diesem Bereich die größten Schwankungen auftreten, mag damit zusammenhängen, daß der Oscillator geringe Abweichungen von der Erwartungsphase nur schwer unterschieden kann. Die Messung der Abweichung vom Sollwert ist umso schlechter, je kleiner diese Abweichung ist.
Für die Wirksamkeit des Zeitgebers "Licht aus" ist es unwichtig, ob die Zelle sich über die Photosynthese oder die Atmung bzw. Glycolyse im organischen Substrat ernährt. Für mixotrophe und autotrophe Kulturen besteht die gleiche response-Kurve gegenüber Störlicht. Auch der Mitnahmebereich ist bei beiden gleich. Da sich mixotrophe und autotrophe Kulturen aber gegen Temperaturwechsel als Zeitgeber völlig voneinander unterscheiden und auch die Konstanttemperatur auf mixotrophe und autotrophe Kulturen unterschiedlichen Einfluß hat, muß geschlossen werden, daß die Zeitgeber Temperaturänderung und Lichtänderung über verschiedene Informationsketten in der Zelle wirken. Dieser Unterschied wird noch dadurch betont, daß die Phasenverschiebung nach Temperaturwechsel nur über Übergangsschwingungen, solche nach Störlicht ohne Übergangsschwingungen erreicht werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von Licht auf die circadiane Rhythmik der Beweglichkeit von Euglena gracilis wird untersucht. In mixotropher Kultur waren Zellteilung und Vermehrung möglich; Zellen in autotropher Kultur, in einem Minimalmedium ohne organische Substanzen, teilten sich dagegen nicht. Die Versuche ergaben:

1. Für autotrophe und mixotrophe Euglena-Kulturen ist das Signal "Licht aus" unabhängig von der Dauer des Lichtreizes ein entscheidender Zeitgeber. Etwa 8 h nach "Licht aus" folgt ein Minimum, etwa 18 h nach "Licht

aus" ein Maximum. Die response-Kurven für autotrophe und mixotrophe Zellen sind bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Periodenlänge fast identisch.

2. Die Phasenverschiebung nach Störlicht geschieht ohne Übergangsschwingungen (transients).
3. Der Schwellenwert für einen phasenverschiebenden Reiz liegt in der Größenordnung von "Licht aus" nach 2 h weißen Störlichtes mit 1000 Lux oder 6 h weißen Störlichtes mit 1 Lux.
4. Die Grenze des Mitnahmebereiches bei einem Licht-Dunkel-Verhältnis von 1:1 liegt bei Erregerperiodenlängen um 16 h (8:8). Bei höheren Erregerfrequenzen tritt die circadiane Komponente als Grundschwingung auf. Im Grenzbereich der Mitnahme ist die Schwingung nach dem Ende der Fremderregung etwa 3 Tage gelöscht. Sie baut sich erst langsam wieder auf.

Herrn Professor Dr. Erwin Bünning danke ich für sein stetes, förderndes Interesse an dieser Arbeit. Herrn Dr. Klaus Brinkmann danke ich für anregende Diskussionen.

## VII. LITERATUR

ASCHOFF, J., K.KLOTTER u. R.WEVER: Circadianer Wortschatz. in: J.ASCHOFF (ed.): Circadian clocks. Amsterdam, 1965

BRINKMANN, K.: Temperatureinflüsse auf die circadiane Rhythmik von Euglena gracilis bei Mixotrophie und Autotrophie, Planta (Berl.) 70, 344-389 (1966)

BRINKMANN, K.: im Druck (1967)

BRINKMANN, K.: mündliche Mitteilung (1967a)

BRUCE, V.G.: Environmental entrainment of circadian rhythms Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 25, 371-378 (1960)

BRUCE, V.G. and C.S.PITTENDRIGH: Resetting the Euglena clock with a single light stimulus. Am. Naturalist 92 295-306 (1958)

BÜNNING, E.: The physiological clock. New York, 1967

FELDMANN, J.F.: Lengthening the period of a biological clock in Euglena by cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. Nat.Acad.Sci. 57, 1080-1087 (1967)

FLÜGEL, A.: Die Gesetzmäßigkeiten der endogenen Tagesrhythmik Planta (Berl.) 37 (1949) 337-375

KLEINHOONTE: Arch. neerl. Sci. IIIb 5, 1-110 (1929)

POHL, R.: Tagesrhythmus im phototaktischen Verhalten der Euglena gracilis. Z.Naturforsch. 3b, 367-374 (1948)

SOLLBERGER, A.: Biological rhythm research. Amsterdam, 1965

WEVER, R.: Einzelorganismen und Population im circadianen Experiment. Eine methodische Analyse. Z.vergl. Physiol. 51, 1-24 (1965)

WILKINS, M.B.: The effect of light upon plant rhythms. Cold Spr.Harb.Symp.quant.Biol. 25, 115-129 (1960)

WILKINS,M.B.: An endogenous rhythm in the rate of $CO_2$-output of Bryophyllum. IV. Effect of intensity of illumination on entrainment of the rhythm by cycles of light and darknes. Plant Physiol. 37, 735-741 (1962)

WOLKEN,J.J.: Euglena. An experimental organism for biochemical and biophysical studies. New York, 1967

## Lebenslauf

13.4.1939 als Tochter des Buchhalters Heinrich Schnabel (1943 gefallen) und der Laborantin Ella Schnabel geb. Trodler in Greiz/Thüringen geboren.

1945 - 1953 Grundschule Löbau/Sachsen

1953 - 1957 Oberschule Löbau/Sachsen; Abitur 1957

1957 - 1960 Fachschule für Heimatmuseen, Weißenfels/Saale; Diplom 1960

ab WS 1961/62 Studium der Biologie an den Universitäten Göttingen und Tübingen.

April 1965 - Oktober 1967 Arbeit an der Dissertation: "Der Einfluß von Licht auf die circadiane Rhythmik von Euglena gracilis bei Autotrophie und Mixotrophie" unter Anleitung von Professor Dr. Erwin Bünning am Botanischen Institut der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren:
in Botanik: Bünning, Firbas, Mägdefrau, Metzner, Kultsch, Pirson,
in Chemie: Brockmann, Glemser,
in Genetik: Egelhaaf, Seyffert, Wittmann,
in Geologie: Bederke, Seilacher, Wagner,
in Mikrobiologie: Pfennig, Schlegel, Zähner,
in Physik: Flammersfeld, Hilsch,
in Physiologischer Chemie: Deuticke, Hollmann, Weitzel,
in Zoologie: Ax, Birukow, Grell, Möhres, Pipho.

Gerhard Schnabel